

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 518 290**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 14/79 (2006.01)

A61K 38/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2008 E 13175557 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2650302**

54 Título: **Método de eliminación de endotoxinas de proteínas**

30 Prioridad:

10.07.2007 US 948839 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.11.2014

73 Titular/es:

**GLANBIA NUTRITIONALS (IRELAND) LIMITED
(100.0%)
Glanbia House
Kilkenny, IE**

72 Inventor/es:

**THOMSON, KEVIN;
WARD, LOREN y
WROBEL, STAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 518 290 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de eliminación de endotoxinas de proteínas

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/948839 presentada con anterioridad el 10 de julio de 2007.

Campo de la invención

- 10 La invención se refiere a métodos de eliminación de endotoxinas de proteínas. Más específicamente, la invención se refiere a métodos de eliminación de endotoxinas de las proteínas que se unen a la endotoxina y a productos generados mediante ese proceso.

Antecedentes de la invención

- 15 El término "endotoxina" se usa más comúnmente para referirse a un complejo de lipopolisacárido asociado con la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, aunque hay una variedad de microorganismos que tienen componentes "de tipo endotoxina". La endotoxina se asocia con una variedad de efectos negativos en las células y los tejidos, incluyendo el fomento de la muerte celular y la activación de las citocinas proinflamatorias y el óxido nítrico. A niveles suficientes en el organismo, la endotoxina puede producir un "choque tóxico", una afección con peligro para la vida. Nakagawa *et al.* (Nakagawa, Y. *et al.* "Endotoxin Contamination in Wound Dressings Made of Natural Biomaterials.", *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 66B: 347-355, 2003), demostraron que la contaminación por endotoxinas en nueve apósitos para heridas naturales diferentes pudo producir fiebre en conejos.

- 25 Se ha desarrollado una variedad de métodos para la eliminación de la endotoxina de las proteínas. Sin embargo, estos métodos, no se prestan a la producción de grandes cantidades de composiciones exentas de endotoxina. Durante años, la eliminación total de la endotoxina normalmente solo se lograba con la pérdida masiva de sustrato proteico durante el proceso. Más recientemente, se han desarrollado productos para aumentar la eliminación de la endotoxina con la recuperación significativa del sustrato proteico, pero, hasta la fecha, estos productos y los métodos en los que se basan no han sido adecuados para la producción de grandes cantidades de proteína exenta de endotoxina de una manera rentable. Algunos métodos, tales como el descrito por Naidu (patente de EE.UU. N° 7.125.963) utilizan una metodología de múltiples etapas y múltiples reactivos para la eliminación de la endotoxina. Para algunos productos, es deseable limitar el uso de algunos de estos reactivos, tales como detergentes/tensioactivos, que pueden ser costosos cuando se usan en grandes cantidades. Así pues, un método de este tipo puede tener un coste prohibitivo para la preparación de algunos productos.

El documento WO95/22258A describe un método de purificación de lactoferrina humana usando una resina de intercambio catiónico.

- 40 La lactoferrina es una proteína multifuncional que pertenece a la familia de las proteínas transferrinas. Se trata de una proteína de 80 kDa, que se encuentra principalmente en la leche y en las secreciones mucosas. La lactoferrina se une al hierro, a la heparina, al proteoglicano, al ADN, a los oligodesoxinucleótidos y a los LPS (endotoxinas). Se han identificado dos sitios de unión a los LPS en la lactoferrina, la región del bucle 28-34 y cuatro argininas N-terminales (restos 2-5). Se ha demostrado la eficacia de la lactoferrina contra los efectos biológicos de las endotoxinas. Sin embargo, la lactoferrina se une fácilmente a la endotoxina, y sería deseable eliminar la endotoxina unida y mejorar el beneficio global que la lactoferrina puede proporcionar. Además, sería beneficioso desarrollar métodos para eliminar la endotoxina de grandes cantidades de una variedad de diferentes proteínas, y especialmente de aquellas proteínas que se unen a la endotoxina.

Sumario de la invención

- La invención se refiere a un método según lo definido en las reivindicaciones. Lo descrito se refiere a un método de eliminación de la endotoxina de una proteína, comprendiendo el método la unión de la proteína a una resina de intercambio catiónico, eluyendo la endotoxina de la proteína unida con el uso de una solución de baja fuerza iónica (es decir, baja concentración de sal) sin tensioactivo añadido, y eluyendo la proteína de la resina con el uso de una solución de alta fuerza iónica tal como una composición con alta concentración de sal, ácido u otras composiciones adecuadas. El método puede comprender además las etapas de filtrar la proteína eluida y secar el producto de la etapa de ultrafiltración. También se describe el uso de la distribución fractal para aplicar la proteína con la endotoxina unida, la solución de baja fuerza iónica y la solución de alta fuerza iónica a una columna de intercambio catiónico.

- También se describe un método de eliminación de la endotoxina de lactoferrina, lactoferrina, lactoperoxidasa y/u otras proteínas unidas a la endotoxina, así como productos exentos de endotoxina, tales como lactoferrina exenta de endotoxina (LEE), producidos mediante el método. Cuando se aísla de la leche o de una fracción de leche, dicho producto también puede comprender factores adicionales derivados de la leche que tengan propiedades deseables tales como, por ejemplo, glucomacropéptido, factores de crecimiento u otras proteínas, lípidos, etc., y en particular

aquellos agentes derivados de la leche bovina que tienen actividad de unión a endotoxinas o actividad neutralizante de endotoxinas. También se describen composiciones que también pueden comprender LEE y xilitol, opcionalmente suplementados con una composición antimicrobiana que comprenda plata.

- 5 También se describen métodos de tratamiento de una herida aguda y de tratamiento de afecciones asociadas con las biopelículas, incluyendo heridas crónicas, que comprenden administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un lactoferrina bovina derivada de la leche exenta de endotoxina. Los métodos también pueden comprender la administración de agentes activos adicionales tales como, por ejemplo, lactoferrina activada, xilitol, una composición antimicrobiana de plata o una combinación de los mismos.

10

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es un diagrama de flujo que describe una realización del presente método de eliminación de la endotoxina de una composición proteica.

- 15 La Fig. 2 es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un ensayo XTT realizado tras una exposición de 24 horas a los productos de lactoferrina indicados en el eje x (medios + suero + producto).

La Fig. 3 es una fotografía de células expuestas a lactoferrina al 1 % con bajo contenido de endotoxina (izquierda) y a lactoferrina al 1 % con contenido medio de endotoxina (derecha). Los medios contenían suero de ternera fetal.

- 20 La Fig. 4 es una fotografía de células expuestas a lactoferrina al 2 % con bajo contenido de endotoxina (izquierda) y a lactoferrina al 2 % con contenido medio de endotoxina (derecha). Los medios contenían suero de ternera fetal.

La Fig. 5 es una fotografía de células expuestas a lactoferrina al 3 % con bajo contenido de endotoxina (izquierda) y a lactoferrina al 3 % con contenido medio de endotoxina (derecha). Los medios contenían suero de ternera fetal.

25

La Fig. 6 es una fotografía de células tratadas como control (EpiLife® + suero de ternera fetal al 1 %, sin lactoferrina añadida).

Descripción detallada

30

Los inventores han desarrollado un nuevo método de eliminación de la endotoxina de una proteína. El método no requiere el uso de detergentes/tensioactivos y, a diferencia de los métodos actualmente disponibles, es adecuado para la producción de cantidades en kilogramos de proteína exenta de endotoxina de una manera rentable. El método de la invención se puede usar fácilmente para producir grandes cantidades (por ejemplo, kilogramos), por ejemplo, de lactoferrina bovina de leche o fracciones lácteas. Los inventores han usado el método para eliminar la endotoxina de la lactoferrina, generando, de este modo, un producto de lactoferrina exenta de endotoxina (LEE). Como se usa en el presente documento, la expresión "exento/a de endotoxina" pretende describir composiciones de lactoferrina que comprenden menos de aproximadamente 20 unidades de endotoxina por miligramo de proteína (UE/mg), más preferentemente menos de aproximadamente 10 UE/mg, e incluso más preferentemente menos de aproximadamente 1 UE/mg, de manera que la composición, en comparación con los aislados de lactoferrina que se encuentran actualmente en el mercado, está sustancialmente exenta de endotoxina. Entre los productos fabricados mediante el proceso de la invención se incluyen los productos fabricados a partir de suero de leche dulce que tienen de aproximadamente 0 a aproximadamente 20 UE/mg, productos que tienen de aproximadamente 0 a aproximadamente 15 UE/mg, productos que tienen de aproximadamente 0 a aproximadamente 10 UE/mg, productos que tienen de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 UE/mg y productos que tienen menos de 1 UE/mg, por ejemplo. Los productos disponibles actualmente en el mercado pueden tener, por ejemplo, al menos aproximadamente 20 UE/mg de lactoferrina si proceden de la leche y al menos aproximadamente 250 UE/mg de lactoferrina si proceden de suero dulce de la leche. Para los productos de LEE derivados de la leche, la expresión "exentos de endotoxina" pretende comprender los productos de LEE que tienen una cantidad inferior o igual a 1 UE/mg.

50

Los productos comerciales que comprenden lactoferrina aislada de la leche y fracciones lácteas son producidos por una serie de empresas. Sin embargo, los análisis de estos productos demuestran que dichos productos de lactoferrina contienen cantidades de endotoxina asociada con la lactoferrina que son significativas si se observan en el contexto del tratamiento de heridas en particular (véase la Tabla 1). El método de la presente invención proporciona un medio por el cual se pueden producir grandes cantidades de LEE a partir de leche bovina y/o una o más fracciones lácteas, por ejemplo, dando lugar a un producto que tiene niveles de endotoxina significativamente inferiores, y que ha demostrado proporcionar un mayor efecto beneficioso para las células que habitan en el entorno de la herida que los productos de lactoferrina bovina derivada de la leche que se encuentran actualmente en el mercado.

60

Tabla 1

| Niveles de endotoxina asociada a la lactoferrina en aislados comerciales de lactoferrina derivada de la leche | | |
|---|---------------------------|---|
| Número del producto | Fuente de la lactoferrina | Nivel de endotoxina (expresado como unidades de endotoxina por miligramo) |
| 1 | Suero dulce de la leche | 1.000-1.250 UE/mg |
| 2 | Suero dulce de la leche | 250-300 |
| 3 | Suero dulce de la leche | 250-300 |
| 4 | Leche | 20 |

Los métodos descritos anteriormente de eliminación de la endotoxina de proteínas tales como, por ejemplo, la lactoferrina, se basaban en el uso de tensioactivos para ayudar en la separación de la endotoxina unida de la lactoferrina. Sin embargo, los tensioactivos son caros, y el uso de tensioactivos para eliminar la endotoxina de la proteína tiene un coste prohibitivo cuando se requieren procesos a mayor escala para fabricar cantidades comerciales de proteína exenta de endotoxina. Los inventores han descubierto que el uso de una combinación de solución de baja fuerza iónica (por ejemplo, baja concentración de sal) usada para eluir la endotoxina de una proteína fuertemente unida a una columna de intercambio catiónico, seguida de la elución de la proteína con una solución de alta fuerza iónica (por ejemplo, alta concentración de sal, ácido, etc.), elimina la necesidad del tensioactivo. Las soluciones de baja concentración de sal pueden comprender, por ejemplo, soluciones salinas de 0,01 a 0,5 molar y, en algunas realizaciones, pueden comprender, por ejemplo, soluciones salinas de 0,25 a 0,35 molar. Los métodos para preparar dichas soluciones y seleccionar la fuerza iónica, molaridad, etc. apropiadas para los métodos de intercambio iónico son conocidos por los expertos en la materia.

La lactoferrina se une a una serie de compuestos, incluyendo el hierro, la heparina, el proteoglicano, el ADN, los oligodesoxinucleótidos y los LPS (endotoxinas). Se han identificado dos sitios de unión a los LPS en la lactoferrina, la región del bucle 28-34 y cuatro argininas N-terminales (restos 2-5). Se ha demostrado la eficacia de la lactoferrina contra los efectos biológicos de las endotoxinas. La lactoferrina es especialmente eficaz para la inhibición de la reconstitución de la biopelícula en una herida crónica, y las composiciones de la presente invención se pueden usar en métodos para inhibir tanto la formación como la reconstitución de biopelículas. Dichas composiciones también pueden proporcionar un tratamiento eficaz de las heridas agudas en las que todavía no se haya desarrollado una biopelícula, ya que la endotoxina proporcionada por una composición de lactoferrina distinta de una LEE es perjudicial para los queratinocitos humanos primarios, y se sabe que produce un efecto desencadenante de la respuesta inflamatoria, que en realidad puede retrasar la curación de la herida. Por lo tanto, las composiciones sin LEE no pueden proporcionar una respuesta tan rápida de curación de la herida como la de las composiciones de LEE.

El método de eliminación de la endotoxina de una proteína comprende las etapas de hacer pasar una composición líquida que comprende la proteína con endotoxina unida a través de un sistema de intercambio catiónico para unir una proteína a la resina de intercambio catiónico, eluyendo la endotoxina de la proteína con el uso de una solución de baja fuerza iónica tal como, por ejemplo, una solución de baja concentración de sal, eluyendo la proteína de la resina de intercambio catiónico con el uso de una solución de alta fuerza iónica tal como, por ejemplo, una solución de alta concentración de sal, uno o más ácidos, etc., opcionalmente seguida de las etapas de filtrar la proteína eluida y secar la proteína. El secado de la proteína se puede realizar usando métodos conocidos por los expertos en la materia tales como la liofilización, el secado por pulverización, etc. La filtración se puede realizar, por ejemplo, usando métodos de ultrafiltración conocidos por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, la etapa de unión de la proteína a la resina de intercambio catiónico se puede realizar usando una columna de intercambio catiónico tal como las fabricadas y/o comercializadas por BioRad, Amalgamated Research, Inc., y otros. Los inventores recomiendan que la resina de intercambio catiónico se seleccione para que se una fuertemente a la proteína que se vaya a purificar con el fin de aumentar al máximo la eficiencia del proceso.

El método se puede realizar de acuerdo con el siguiente ejemplo. Se sugieren condiciones del proceso, pero no se pretende que sean limitantes, ya que está dentro del alcance de los expertos en la materia modificar estas condiciones de proceso, dependiendo del sistema de intercambio catiónico usado, el sistema/método de ultrafiltración usado, etc. Los inventores sugieren que todos los procesos se realicen a una temperatura de o inferior a 4,4 °C (40 °F) con el fin de limitar el posible crecimiento de contaminantes microbianos. Este proceso también se puede ilustrar mediante el diagrama de flujo en la Fig. 1. En resumen, se prepara una columna de intercambio iónico, tal como una columna de intercambio iónico ARi habitual de 300 mm x 200 mm (Amalgamated Research, Inc.) con cabezales de distribución fractal y que tenga un volumen de columna de aproximadamente 9,5 l, para cargarla mediante la adición de al menos 3 o más volúmenes de columna de agente cáustico (0,2 N) a un caudal de 400-500 litros por hora, seguida del flujo descendente o ningún flujo antes de la adición de tampón (por ejemplo, tampón fosfato, 1 % a pH 6-7,5) con un caudal de 50-400 litros por hora para lavar abundantemente hasta que el pH alcanza un valor inferior a aproximadamente 8. Luego se añade sal en forma de una solución de 80-100 mS/cm 1

molar y se ajusta el caudal hasta aproximadamente 50-400 litros por hora para uno o más volúmenes de columna (preferentemente 2), y se lava abundantemente con agua la columna a un caudal de 50 a 500 litros por hora. Para todas las etapas anteriores, se recomienda un caudal de 300 litros por hora para una columna tal como la ARi de 300 mm x 200 mm. Como es sabido por los expertos en la materia, se pueden usar diversos tamaños de columna, y los volúmenes se ajustarán en consecuencia.

A continuación, se carga la columna con una composición líquida de lactoferrina (5-10 %), estando un ejemplo de dicha composición disponible en el mercado y comercializado como Bioferrin 2000 (Glanbia Nutritional, Inc., Monroe, Wisconsin). La composición de lactoferrina líquida se puede derivar u obtener de una variedad de fuentes, incluyendo, por ejemplo, suero dulce de la leche, leche y/o fracciones lácteas, y puede incluir diversas formas de lactoferrina tales como (holo)lactoferrina saturada de metal y (apo)lactoferrina exenta de metal. También se pueden incluir otras proteínas y sustancias derivadas de la leche en una composición líquida de lactoferrina, pero dicha composición preferentemente será una composición de lactoferrina enriquecida o una composición de lactoferrina purificada. Para la columna descrita anteriormente, se cargan de 1,5 a 20 litros de composición líquida de lactoferrina en la columna, recomendándose cargar 10 litros. Se ajusta el caudal hasta 50 a 400 litros por hora (recomendándose 100 litros por hora) de flujo descendente. Luego se lava abundantemente la columna con uno o más volúmenes de columna de agua a un caudal de 50-400 litros por hora. Sin quedar vinculados a teoría alguna, los inventores creen que la distribución fractal proporciona un beneficio adicional para la eliminación de endotoxina a través del intercambio iónico, tal como en el método de intercambio catiónico descrito en el presente documento.

A continuación, se añade una solución de baja concentración de sal (28-37 mS/cm) a la columna y se ajusta el flujo a 50-400 litros por hora (recomendándose 150 litros por hora) para que la solución de baja concentración de sal pase a través de la columna en 2 o más volúmenes de columna. Luego, se añade una solución de alta concentración de sal (80-100 mS/cm), en uno o más volúmenes de columna (recomendándose 1,4), y se ajusta el flujo hasta 50 a 400 litros por hora (recomendándose 200 litros por hora). Luego, se lava abundantemente la columna con agua en uno o más volúmenes de columna y un caudal de 50-400 litros por hora (recomendándose 360 litros/hora), seguido de un flujo ascendente cítrico abundante (citrato al 0,5 %) para 1 o más volúmenes de columna a un caudal de 50 a 400 litros/hora (prefiriéndose 300 l/h). Al flujo ascendente abundante de citrato le sigue un flujo descendente abundante de citrato de 3 o más volúmenes de columna a un caudal de 50-400 litros/hora (preferentemente, de 300 litros/hora).

A continuación, se realiza un lavado abundante con agua, usando al menos dos volúmenes de columna de agua a un caudal de 50-400 litros/hora (400 l/h), seguido de la adición de una solución de alta concentración de sal (80-100 mS/cm) para 1 o más volúmenes de columna en un volumen de 50-400 litros/hora (300 l/h). Se dejan pasar al menos dos volúmenes de columna de agua a través de la columna. Se recoge la proteína exenta de endotoxina (lactoferrina) en recipientes adecuados tales como cubos esterilizados, tanques de acero inoxidable, etc.

Luego se somete el producto del sistema de intercambio iónico a ultrafiltración. En resumen, se transfiere el producto de contenido reducido de endotoxina del sistema de intercambio iónico a un tanque de equilibrio refrigerado hasta llenarlo, o hasta que se alcanza la cantidad del lote deseada. El sistema de ultrafiltración (membrana de 10 kDa) se hace funcionar a 4,4 °C (40 °F) o una temperatura inferior. Se concentra el producto hasta aproximadamente el 4 % de los sólidos, y luego se añade agua de diafiltración hasta que la conductividad del material retenido es inferior a 8,0 mS/cm. Se vierte el líquido en un recipiente exento de endotoxina y se mantiene a una temperatura inferior a aproximadamente 4,4 °C (40 °F). Se limpia el dispositivo de ultrafiltración usando limpiador ácido Ecolab AC-55-5 (500 ml/94,6 l (25 gal)), que se deja en circulación durante lo menos 30 minutos a 1 hora. Se usa una sustancia cáustica para limpiar dejando en circulación 0,2 M durante al menos 6 horas, y preferentemente durante 12 horas. A continuación, se enjuaga el sistema con agua exenta de endotoxina (0,2 UE/ml) hasta que el pH es inferior a 8,0. (La filtración del agua se realiza usando un sistema AB3NFZ7PH4 de Flow Solutions).

Para el producto liofilizado, se deben empapar todas las superficies de contacto con el producto con sustancia cáustica 0,2 M durante al menos 6 horas, y preferentemente 12 horas o más, y enjuagar a fondo con agua exenta de endotoxina antes de que entren en contacto con el producto. Un método adecuado para secar el producto se puede seleccionar entre los métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, la liofilización, el secado por pulverización y otros métodos. El polvo resultante se puede envasar en uno o más recipientes exentos de endotoxina adecuados.

Se han descrito métodos para la purificación y el aislamiento de la LF de una variedad de fuentes, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 4,190,576; 4,436,658; 4,667,018; 4,668,771; 4,791,193; 4,997,914; 5,087,369; 5,149,647; 5,169,936; 5,179,197; 5,516,675; 5,571,896; 5,596,082; 5,756,680; 5,849,885; 5,861,491; 5,919,913; 6,010,698; 6,096,870 y 6,268,487. Las composiciones líquidas de lactoferrina para su uso en el método pueden comprender cualquier composición que contenga lactoferrina, pero preferentemente comprenden una concentración enriquecida (es decir, superior al 2 %) de lactoferrina. La lactoferrina se puede aislar directamente de la leche, o se puede aislar de fracciones lácteas tales como, por ejemplo, el suero de la leche y/o aislado de proteína del suero de la leche. En términos industriales, dicho producto de lactoferrina se consideraría "enriquecido" o "sustancialmente purificado". Dicha composición también puede incluir otros compuestos que se encuentran en la leche o en aislados de la leche,

incluyendo lactoperoxidasa, factores de crecimiento, calcio y otras composiciones.

En un aspecto, un producto de lactoferrina derivada de la leche (PLDL) comprende al menos aproximadamente el 10 % de lactoferrina bovina, que puede tener un contenido de hierro de aproximadamente 15 mg/100 g a aproximadamente 40 mg/100 g. En otros aspectos, el PLDL puede comprender al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 75 % o al menos aproximadamente el 90 % de lactoferrina. Algunas formas de PLDL también pueden comprender la forma de lactoferrina de apolactoferrina, proporcionando una concentración de hierro de aproximadamente 0 mg/100 g a aproximadamente 15 mg/100 g. En algunas realizaciones, la apolactoferrina puede comprender una concentración de hierro de aproximadamente 4 mg/100 g a aproximadamente 15 mg/100 g.

Bioferrin® 1000 (Glanbia Nutritionals, Inc.) es un producto natural de proteína derivada de la leche biológicamente activo que comprende apolactoferrina bovina procedente de suero dulce de la leche recién extraído. Se aísla usando técnicas de separación de fraccionamiento conocidas por los expertos en la materia, y comprende más del 90 por ciento de proteína, comprendiendo más del 90 % de la proteína total (por ejemplo, 95 %) lactoferrina, principalmente en forma de apolactoferrina (<15 mg de hierro/100 g). Bioferrin® 2000 es un producto similar, excepto que el hierro está presente a un nivel que es de aproximadamente 15 a 40 mg/100 gramos de producto.

En el método de la presente invención, se puede usar una composición que comprende lactoferrina bovina en forma de apolactoferrina y/o en la forma de mayor cantidad de hierro para producir un producto exento de endotoxina. En general, para el cuidado de heridas, la forma de apolactoferrina puede proporcionar beneficios adicionales, aunque ambas formas han demostrado ser eficaces. Las endotoxinas son productos lipopolisacáridos que se liberan cuando las bacterias Gram-negativas, tales como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, mueren. Las heridas que son difíciles de tratar con métodos de cuidado de heridas convencionales, en general, contienen una biopelícula establecida, que es más habitual que la que no consta de una población mixta de microorganismos. Se ha informado de que la producción de endotoxinas en una biopelícula es de al menos aproximadamente 1.000 unidades/cm² (Rioufol, C. *et al. J. Hosp Infect.* (1999) 43: 203-209). Los estudios realizados en el centro de ingeniería de biopelículas de la Universidad Estatal de Montana han demostrado que una reducción logarítmica de la biopelícula asociada con un tubo de hemodiálisis se correlaciona con una reducción lineal del nivel de endotoxina. Otros estudios adicionales realizados en el CBE del estado de Montana también han demostrado que una biopelícula que comprende principalmente *Pseudomonas aeruginosa* produce aproximadamente de 3.100 a 6.200 (4.300 de media) unidades de endotoxina por centímetro cuadrado de biopelícula. Las heridas crónicas se caracterizan por un aumento de las citocinas proinflamatorias, un aumento de las metaloproteasas de la matriz, bajos niveles de inhibidores tisulares de las metaloproteasas de la matriz y bajos niveles de citocinas del factor de crecimiento, así como la degradación de los receptores en las células que constituyen el lecho de la herida (células senescentes). Muchas de estas características se han asociado con la endotoxina. En el entorno de la herida, se ha encontrado que las endotoxinas estimulan la producción de los mediadores inflamatorios tales como TNF- α y las interleucinas, que estimulan la producción de metaloproteinasas de la matriz (MMP). Las heridas que no cicatrizan se han asociado con un aumento prolongado de los niveles de MMP, que puede contribuir a la degradación de los factores de crecimiento, los receptores celulares y otros componentes del tejido sano. Las endotoxinas bacterianas disminuyen la resistencia a la tracción de la herida, disminuyen la deposición y la reticulación del colágeno, y se han asociado con la dehiscencia de las heridas quirúrgicas (Metzger, Z. *et al.* (2002) *J. Endod.* 28 (1): 30-33). Especialmente para una herida aguda, un producto de LEE de la invención puede ser particularmente beneficioso, pues un producto de este tipo limitará el potencial de muerte celular y una respuesta inmune no deseada en el tejido de la herida que puede retardar el proceso de curación de la misma.

La invención también proporciona un lactoferrina exenta de endotoxina (LEE) fabricada mediante el método anteriormente mencionado. Las composiciones de proteína lactoferrina de origen humano o animal, fabricadas a través de métodos de tecnología de ADN recombinante o aisladas de la leche, se pueden purificar mediante el método de la presente invención. La LEE puede ser especialmente eficaz para aquellas aplicaciones en las que se sugiera que la lactoferrina es beneficiosa, pero en las que los efectos de la endotoxina unida a la lactoferrina sean especialmente no deseados. La LEE de la presente invención se puede incorporar a un enjuague bucal, pasta de dientes, bebidas nutricionales, alimentos, productos para el cuidado de heridas tales como cremas, geles, vendas y otros productos para el cuidado de heridas, productos cosméticos tales como cremas, lociones y geles usados para una variedad de aplicaciones, incluyendo anti-envejecimiento, la medicación del acné y otros usos. La LEE se puede usar para el tratamiento de heridas agudas y/o crónicas. La LEE se puede proporcionar para todos los usos mencionados anteriormente, y para otros usos, en combinación con otros agentes activos tales como xilitol, antibióticos, antioxidantes y otros agentes seleccionados para el fin concreto para el que la composición de LEE se vaya a formular, tales como para el cuidado de heridas, el cuidado oral y/o el cuidado de la piel.

Recientemente, se ha demostrado que una composición que comprende lactoferrina derivada de leche bovina y/o derivada de suero de la leche bovina proporciona un agente tópico para el cuidado de heridas seguro, altamente eficaz, abundante y asequible. Los inventores han demostrado que las composiciones de la presente invención son superiores a las composiciones de lactoferrina bovina disponibles actualmente en el mercado en términos de potenciación de la viabilidad celular de los queratinocitos humanos primarios, un tipo de célula conocido por ser necesario para la curación de las heridas. Como se ilustra en las Figuras 2 a 8, cuando se comparan composiciones "de bajo contenido de endotoxina" (es decir, de aproximadamente 400 UE/mg) y composiciones de "contenido medio

de endotoxina" (es decir, de aproximadamente 0,40 UE/mg) en cultivos celulares de queratinocitos con o sin la adición de suero a los medios, la adición del producto de contenido medio de endotoxina produce una muerte celular significativa tanto en presencia como en ausencia de suero, mientras que la viabilidad celular se mantiene en los cultivos a los que se añade el producto de bajo contenido de endotoxina. Para el cuidado de las heridas agudas, esta diferencia puede ser especialmente beneficiosa. Una diferencia significativa entre las heridas agudas y crónicas es que las heridas crónicas, en general, se asocian con la presencia de una biopelícula bacteriana. Las endotoxinas de las bacterias producen una cascada de efectos celulares e inmunológicos que, en general, se considera que retrasan el proceso de curación de las heridas. Aunque la lactoferrina potencia la curación de las heridas, en general, la lactoferrina humana se debe obtener a través de métodos de ADN recombinante que pueden ser caros y también pueden producir una proteína asociada con endotoxina, y la lactoferrina bovina, aunque proporciona una fuente más fácilmente disponible de endotoxina, también es probable que esté asociada a la endotoxina unida. La lactoferrina bovina purificada mediante el método de la invención proporciona una composición para el cuidado de heridas que puede ser especialmente eficaz para su aplicación a heridas agudas a través de polvos, geles, cremas, pomadas, vendas u otras composiciones/productos, ya que esta forma de lactoferrina no introduce endotoxina en el entorno de la herida y, como se demuestra por los experimentos descritos en el presente documento, no contribuye a la muerte de los queratinocitos.

Basándose en los resultados de la comparación de los inventores entre los productos de LEE y de mayor contenido de endotoxina, en el presente documento, también se proporciona un método para mejorar la curación de las heridas crónicas y agudas, así como un método para reducir la formación y la reconstitución de biopelículas en afecciones que están asociadas con la formación y la reconstitución de biopelículas, que incluyen, pero sin limitación, queratitis asociada con las lentes de contacto, endoftalmítis, otitis media, amigdalitis crónica, rinosinusitis crónica, heridas en el glúteo, úlceras de decúbito, infecciones del sitio quirúrgico, úlceras del pie diabético, enfermedad inflamatoria intestinal, úlceras pépticas, heridas superficiales asociadas con la infección postoperatoria y vaginosis. Por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 6.455.687, se describe una variedad de usos para los seres humanos. La LEE de la presente invención también es adecuada para los usos terapéuticos que se han identificado para la lactoferrina humana. Para estas y otras afecciones asociadas con el establecimiento y la reconstitución de biopelículas, las composiciones que comprenden LEE se pueden proporcionar y administrar en forma de gotas para los ojos, gotas para los oídos, pulverizados orales, pastillas, tiras de disolución rápida, pulverizados nasales, soluciones de irrigación de los senos nasales, pomadas, cremas, geles, componentes de vendajes, comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas, líquidos y otras composiciones de uso apropiado que pueden comprender además excipientes, aromatizantes, colorantes y agentes activos apropiados adicionales.

Las composiciones de lactoferrina exenta de endotoxina son especialmente adecuadas para su aplicación en los tejidos que pueden ser especialmente sensibles a las endotoxinas, y las composiciones de lactoferrina exentas de endotoxina de la presente invención que se fabrican mediante el método de la invención se pueden aplicar a dispositivos que se pueden implantar en tejidos, tales como implantes ortopédicos, prótesis oculares, lentes de contacto y dispositivos anticonceptivos intrauterinos.

También se ha demostrado que la lactoferrina es beneficiosa como agente profiláctico contra la infección viral. Con ese fin, se puede proporcionar para la administración oral a través de una variedad de vehículos para la administración de agentes terapéuticos tales como, por ejemplo, comprimidos, comprimidos efervescentes, tiras orales tales como las fabricadas de pululano que se pueden colocar en la lengua, etc., o se pueden proporcionar, por ejemplo, a través de pulverizados nasales y/o de garganta. Las composiciones de LEE de la presente invención pueden ser especialmente beneficiosas para su uso como pulverizados nasales. En ratas, un modelo animal para la respuesta inmune a la endotoxina, la endotoxina inhalada produce una respuesta dependiente de la dosis en las vías respiratorias nasales y traqueobronquiales de la rata (Gordon, T. y J. R. Harkema, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, Vol. 10, N° 2, pág. 177-183 (1994)). Por lo tanto, las composiciones de LEE de la presente invención pueden proporcionar la lactoferrina para su uso en pulverizados nasales para uso profiláctico contra la infección por virus respiratorios, evitando al mismo tiempo las secreciones mucosas y el malestar asociado que pueden estar vinculados a la exposición a la endotoxina nasal.

En diversas realizaciones, las composiciones que comprenden LEE también pueden comprender al menos un agente adicional para la aplicación tópica en una herida tal como, por ejemplo, un agente hidratante, un gel hidrocoloidal, una composición de solución salina, un dextrano de cadena media (por ejemplo, miel), etc., para su aplicación a una herida aguda o crónica. Las composiciones disponibles en el mercado, tales como, por ejemplo, los apósitos DuoDerm® Hydroactive Dressings (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ), se pueden usar como una base en la que mezclar una cantidad adecuada de LEE (Bioferrin®, Glanbia Nutritionals, Inc., Monroe, WI). Los expertos en la materia conocen los agentes humectantes adecuados para el cuidado de las heridas, encontrándose una selección de dichos agentes disponible en el mercado.

Una composición para la curación de heridas y un método de curación de heridas mediante la administración de la composición pueden comprender LEE y xilitol. Dicha composición también puede comprender opcionalmente agentes antimicrobianos tales como antibióticos, cremas hidratantes u otros agentes para mejorar la tasa de curación de las heridas, así como excipientes y composiciones para facilitar la aplicación tópica de la LEE/el xilitol.

Las composiciones de la presente invención se pueden usar fácilmente en combinación con composiciones y dispositivos que contienen preparaciones antimicrobianas de plata. Las composiciones pueden comprender, por ejemplo, LEE o LEE-A, xilitol, y un producto de plata tal como Acticoat® (Smith and Nephew, Memphis, Tennessee). Acticoat®, por ejemplo, puede proporcionar plata antimicrobiana en forma de un núcleo no tejido de rayón/poliéster laminado entre una capa superior e inferior de malla de polietileno de alta densidad (HDPE) recubierta de plata. Acticoat® Moisture Control (Smith and Nephew, Memphis, Tennessee) es un apósito de espuma que comprende plata en forma nanocristalina. Los productos de plata Actisorb® distribuidos por Johnson & Johnson comprenden un tejido de carbón activo impregnado con plata (33 µg de plata por cm cuadrado de tejido). Los productos Arglaes® (Giltech Ltd., R.U.) también proporcionan polímeros para la liberación de iones de plata a partir de un polvo, apósito de película u otra preparación de aplicación en una herida. Las composiciones de la presente invención se pueden incorporar en dichos productos o usarse en combinación con dichos productos. Una de las ventajas de aumentar el uso de productos de plata con el uso de las composiciones descritas por la invención es la capacidad de incorporar menos plata a los productos, logrando a la vez un mejor efecto sobre la curación de heridas. Como se usa en el presente documento en lo que respecta a los apósitos para heridas que contienen plata, se incluyen ambas composiciones y dispositivos, y pueden incluir productos textiles o polímeros tejidos o no tejidos, alginatos, espumas, polvos, geles, cremas, líquidos, cargas para heridas y otros productos farmacéuticos o dispositivos médicos considerados por los expertos en la materia como apropiados para la administración eficaz de las composiciones de plata en una herida.

La lactoferrina activada y los métodos para producir lactoferrina activada han sido descritos por Naidu en la patente de EE.UU. N° 6.172.040. Naidu describe la inmovilización de la lactoferrina sobre un sustrato al que la lactoferrina se une fácilmente con el fin de aumentar su capacidad de unión al hierro. Una composición que comprende una forma activada de lactoferrina en combinación con una LEE también puede proporcionar una composición eficaz para el cuidado de las heridas.

Para el cuidado de las heridas agudas, las composiciones de LEE de la invención fabricadas mediante el método de la invención también se pueden aplicar a un vendaje para aumentar la curación de las heridas.

Las composiciones de la invención se pueden administrar a seres humanos y/o animales, y los métodos para el uso de dichas composiciones también son adecuados para los seres humanos y/o los animales.

La invención se puede describir además por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo I - Preparación de LEE

Se realizó el intercambio iónico como se ha descrito anteriormente. Las Tablas 2 y 3 ilustran los resultados obtenidos mediante el método descrito en el presente documento.

Tabla 2. Lotes individuales de intercambio iónico

| Día/pasada | LAL (UE/mg) (Método de placa de lisado de amebocitos de Limulus) (técnica cinética)) | Día/pasada | LAL (UE/mg) (Método de placa de lisado de amebocitos de Limulus) (técnica cinética)) | Día/pasada | LAL (UE/mg) (Método de placa de lisado de amebocitos de Limulus) (técnica cinética)) |
|------------|--|------------|--|------------|--|
| 1/1 | 0,701 | 9/1 | 0,331 | 13/5 | 0,233 |
| 1/2 | 0,739 | 9/2 | 0,199 | 13/6 | 0,15 |
| 2/1 | 2,8 | 9/3 | 0,411 | 14/1 | 0,299 |
| 2/2 | 7,356 | 9/4 | 0,428 | 14/2 | 0,162 |
| 2/3 | 6,88 | 9/5 | 0,255 | 14/3 | 0,148 |
| 3/1 | 4 | 9/6 | 0,121 | 15/1 | 0,2398 |
| 3/2 | 2,15 | 10/1 | 0,23 | 15/2 | 0,137 |
| 4/2 | 0,07 | 10/2 | 0,12 | 15/3 | 0,323 |
| 5/3 | 1,88 | 10/3 | 0,131 | 15/4 | 0,159 |
| 5/4 | 1,95 | 10/4 | 0,47 | 15/5 | 0,0788 |
| 5/5 | 1,02 | 10/5 | 0,258 | 15/6 | 0,091 |

| Día/pasada | LAL (UE/mg) (Método de placa de lisado de amebocitos de Limulus) (técnica cinética)) | Día/pasada | LAL (UE/mg) (Método de placa de lisado de amebocitos de Limulus) (técnica cinética)) | Día/pasada | LAL (UE/mg) (Método de placa de lisado de amebocitos de Limulus) (técnica cinética)) |
|------------|--|------------|--|------------|--|
| 6/1 | 0,33 | 11/1 | 1,14 | 15/7 | 0,137 |
| 6/2 | 0,39 | 11/2 | 4,87 | 16/1 | 1,676 |
| 6/3 | 0,81 | 11/3 | 7,413 | 16/2 | 0,731 |
| 6/4 | 0,61 | 11/4 | 2,373 | 16/3 | 0,803 |
| 6/5 | 1,54 | 12/1 | 0,349 | 16/4 | 0,724 |
| 7/6 | 2,45 | 13/1 | 0,327 | 16/5 | 1,015 |
| 8/1 | 0,32 | 13/2 | 0,19 | 17/1 | 0,158 |
| 8/2 | 0,958 | 13/3 | 0,205 | 17/2 | 0,419 |
| 8/3 | 1,353 | 13/4 | 0,125 | | |

Tabla 3. Resultados medios diarios del ensayo de amebocitos de Limulus

| Día | Lotes producidos | UE medias o compuestas |
|-----|------------------|------------------------|
| 1 | 2 | 0,117 |
| 2 | 6 | 0,275 |
| 3 | 5 | 0,242 |
| 4 | 4 | 1,315 |
| 5 | 1 | 0,349 |
| 6 | 6 | 0,168 |
| 7 | 5 | 0,185 |
| 8 | 7 | 0,179 |
| 9 | 5 | 1,015 |
| 10 | 8 | 0,291 |
| 11 | 9 | 0,465 |

Ejemplo 2 - Comparación de los productos en el ensayo de raspado de queratinocitos en medios sin suero

5 Se sembraron queratinocitos humanos primarios en placas de 24 pocillos y se cultivaron hasta el 90-95 % de confluencia. Se arañó el centro del pozo, usando la punta de una pipeta de 200 microlitros. Se lavaron las placas con solución salina tamponada con HEPES y se generaron imágenes (T = 0). Se añadieron trescientos microlitros de producto (producto de lactoferrina bovina convencional disponible en el mercado = contenido medio de endotoxina; producto generado mediante el método de la invención = bajo contenido de endotoxina) a los pocillos correspondientes, y se incubaron las células a 37 °C en CO₂ al 5%. En intervalos de 24 horas, se retiraron los medios y el producto por aspiración, se lavaron las células con solución salina tamponada y se reemplazaron por medio recién preparado con el producto. Se devolvieron las células a la incubadora después del lavado y del cambio de medio/producto. El ensayo finalizó tras 72 horas. El producto ensayado comprendía el 1 % del producto de bajo contenido de endotoxina (LEE) en el medio de cultivo celular, 2 % del producto de bajo contenido de endotoxina (LEE) en el medio de cultivo celular, 1 % del producto de alto contenido de endotoxina (producto disponible en el mercado, aislado de lactoferrina, sin el uso del método de eliminación de la endotoxina) en el medio de cultivo celular y el control (medio de cultivo celular solamente). El medio de cultivo celular no contenía suero bovino fetal/suero de ternera fetal.

20 Al observar las células en cuanto al cierre de la superficie arañada, se advirtió que, aunque ninguna de las superficies arañadas se había cerrado todavía, un efecto más notable fue que las células tratadas con lactoferrina de alto contenido de endotoxina habían muerto o se estaban muriendo a un ritmo rápido, a pesar de estar la endotoxina unida a lactoferrina y presumiblemente neutralizada por la misma.

25

Se realizó un ensayo de XTT de la siguiente manera: transcurridas 72 horas, se retiraron el producto y los medios de las placas, se lavaron las células con HBS y se añadieron 300 microlitros de cada medio de cultivo celular, además de 60 microlitros de XTT a cada pocillo. Como control, se usaron dos pocillos con medio más XTT, pero sin células. El ensayo de XTT mide la escisión del anillo de tetrazolio de XTT debida a la actividad deshidrogenasa mitocondrial, que se espera que sea superior en las células viables, obteniéndose cristales de formazán de color naranja y virando el medio de color rosa a naranja. Tras 4 horas, se tomaron muestras del medio y se midió la absorbancia a 490 nm para cada muestra. A continuación, se ensayó la viabilidad celular mediante exclusión con azul de tripano.

Ejemplo 3 - Comparación de los productos en cultivo de queratinocitos humanos primarios con adición de suero

Se sembraron queratinocitos humanos primarios en placas de 24 pocillos y se cultivaron hasta el 70 % de confluencia. Se lavaron las placas con solución salina tamponada con HEPES y se formaron imágenes (T = 0). Se añadieron trescientos microlitros de producto (producto de lactoferrina bovina convencional disponible en el mercado = contenido medio de endotoxina; producto generado mediante el método de la invención = bajo contenido de endotoxina) a los pocillos correspondientes, y se incubaron las células a 37 °C en CO₂ al 5%. Las muestras ensayadas fueron lactoferrina de bajo contenido de endotoxina al 1 % + medio de cultivo, lactoferrina de bajo contenido de endotoxina al 2 % + medio de cultivo, lactoferrina de bajo contenido de endotoxina al 3 % + medio de cultivo, lactoferrina de contenido medio de endotoxina al 1 % + medio de cultivo, lactoferrina de contenido medio de endotoxina al 2 % + medio de cultivo, lactoferrina de contenido medio de endotoxina al 3 % + medio de cultivo y control (medio de cultivo celular solamente). A las 24 horas, se retiró el medio/producto, se lavaron las células y se añadieron 300 microlitros de medio recién preparado más 60 microlitros de XTT. Se incubaron las células durante 4 horas más, luego se tomaron muestras y se midió la absorbancia a 490 nm. Las lecturas se compararon con los controles (medio de cultivo celular + XTT). Los resultados se muestran en la Figura 2.

Como se muestra en las Figuras 3-6, la aplicación de producto de bajo contenido de endotoxina a las células aumenta significativamente la viabilidad celular frente a la observada tras la aplicación de producto de contenido medio de endotoxina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método exento de tensioactivo de producción de un producto de lactoferrina exento de endotoxina mediante la eliminación de la endotoxina unida a una proteína en una composición líquida de lactoferrina, comprendiendo el método las etapas de:
- 10 a) hacer pasar la composición líquida de lactoferrina que comprende una proteína con endotoxina unida a través de un sistema de intercambio catiónico usando distribución fractal para unir la proteína con la endotoxina unida a la resina de intercambio catiónico;
- 10 b) eluir la endotoxina de la proteína unida usando una solución salina 0,25-0,35 molar en ausencia de tensioactivo añadido; y
- 10 c) eluir la proteína unida con una solución salina que tiene una conductividad de entre 80 y 100 mS/cm para producir un producto de lactoferrina exento de endotoxina;
- 15 donde la proteína con la endotoxina unida se selecciona de una o más de lactoferrina, lactoferricina, lactoperoxidasa y apolactoferrina.
- 20 2. Un método según lo reivindicado en la reivindicación 1, donde la proteína eluida comprende menos de 20 unidades de endotoxina por miligramo de proteína (UE/mg).
- 20 3. Un método según lo reivindicado en la reivindicación 1 o 2, donde la proteína eluida comprende menos de 10 unidades de endotoxina por miligramo de proteína (UE/mg).
- 25 4. Un método según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la proteína eluida comprende menos de 1 unidad de endotoxina por miligramo de proteína (UE/mg).
5. Un método según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la solución salina 0,25-0,35 molar tiene una conductividad de entre 28 y 37 mS/cm.
- 30 6. Un método según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la composición líquida de lactoferrina se obtiene de suero dulce de la leche, leche y/o fracciones lácteas.
- 35 7. Un método según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la etapa de secar la proteína eluida.
8. Un método según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la composición de lactoferrina que se hace pasar a través del sistema de intercambio catiónico comprende más del 2 % de lactoferrina.

Fig. 1

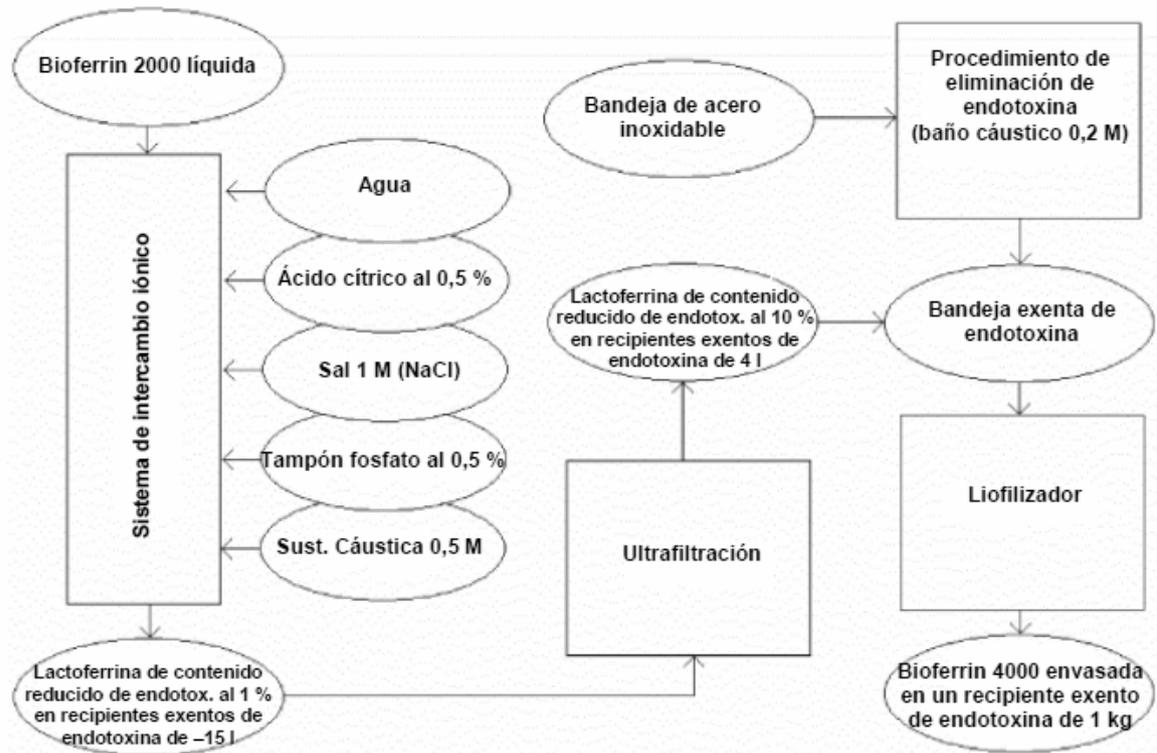


Fig. 2

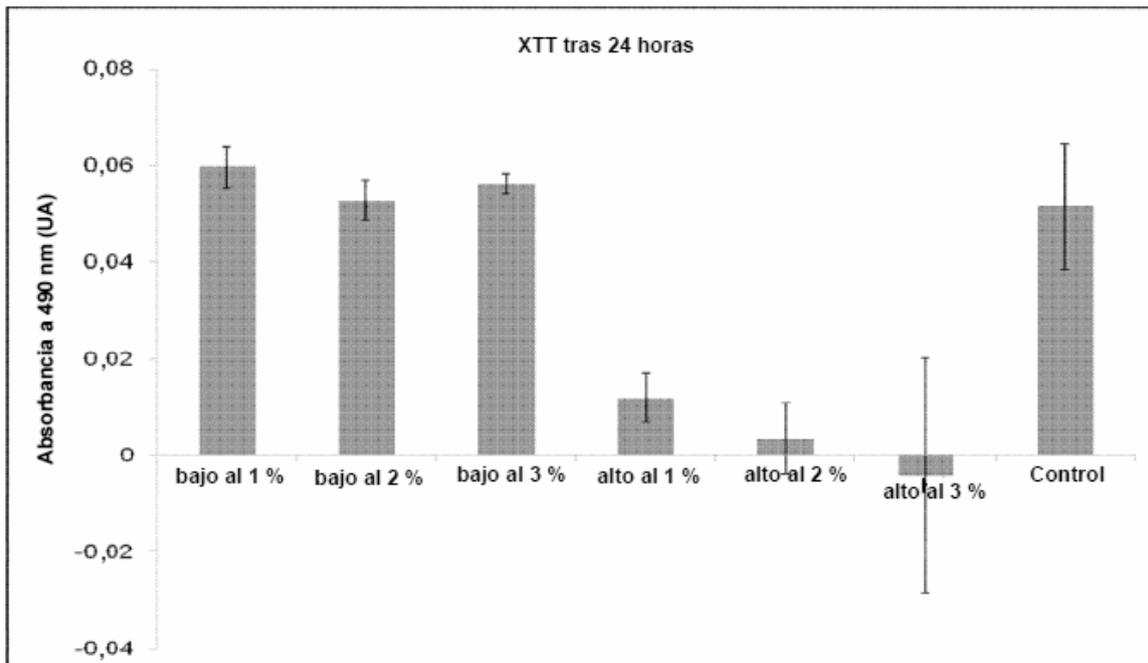


Fig. 3

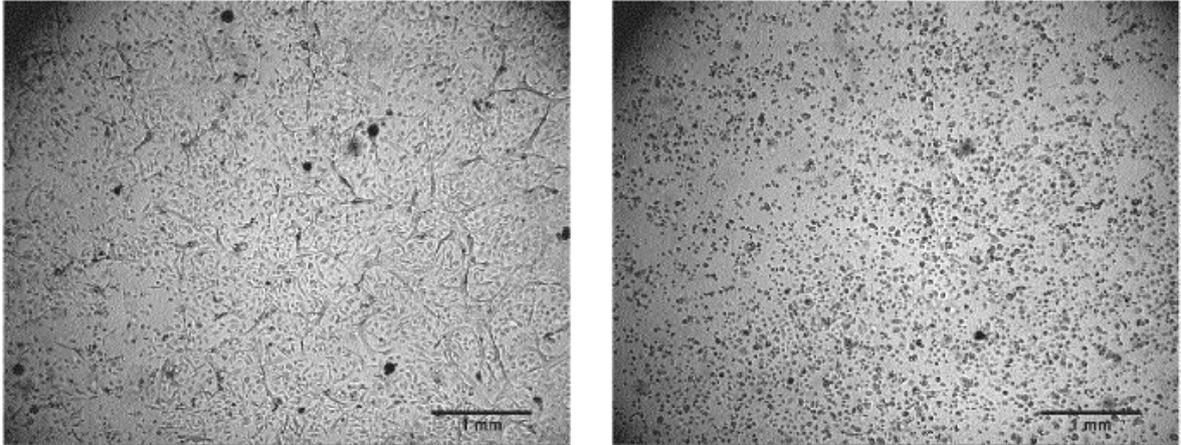


Fig. 4

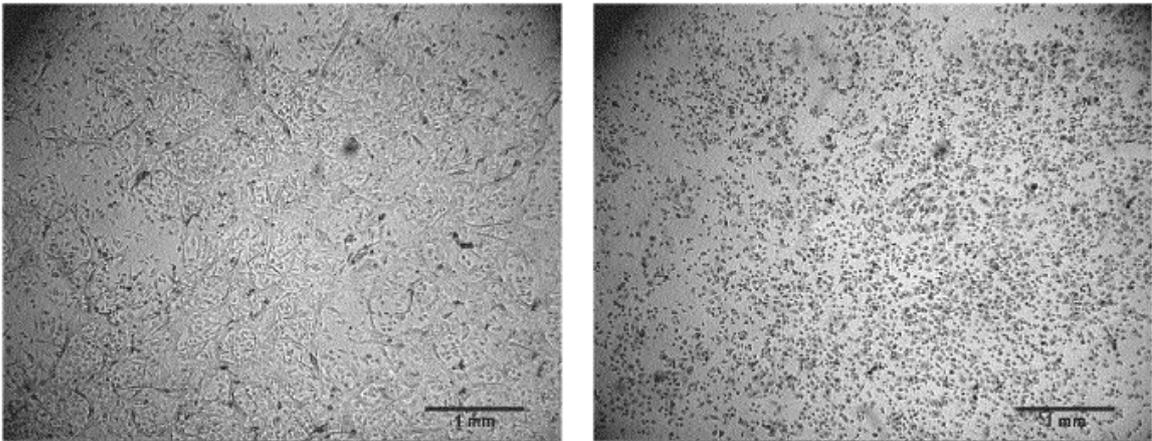


Fig. 5

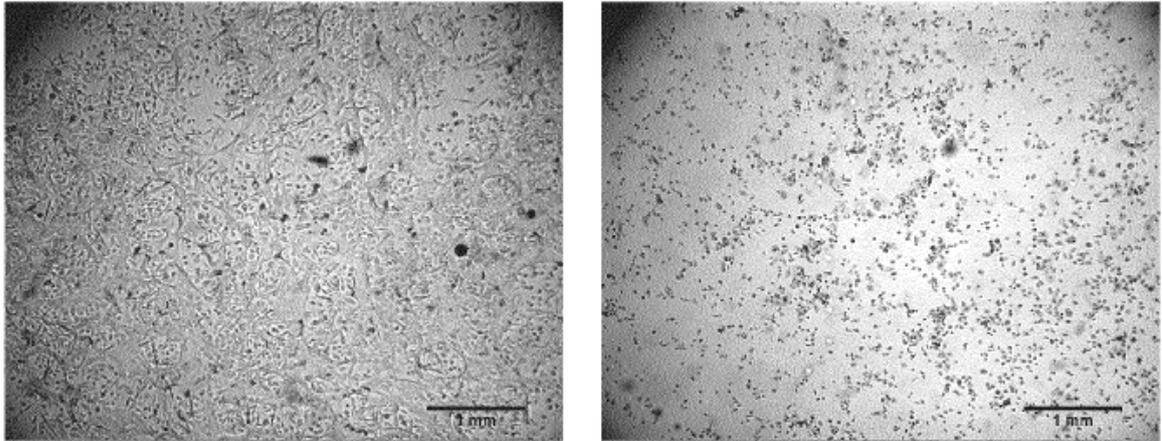


Fig. 6

